

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**DETERMINACIÓN IN VITRO DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS E
IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS, DE AISLADOS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS PROVENIENTES DE CASOS DE MASTITIS
BOVINA.**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS VETERINARIAS**

PRESENTA

MVZ. DAVID ANTONIO LÓPEZ RUIZ

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

DICIEMBRE 2016

COMITÉ ASESOR

Determinación in vitro de resistencia a antibióticos e identificación de genes asociados, de aislados de *staphylococcus aureus* provenientes de casos de mastitis bovina. Tesis presentada por el MVZ. David Antonio López Ruiz como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias veterinarias.

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto

DIRECTOR

Dr. Gilberto López Valencia

ASESOR

Dra. Sawako Oshima Hori

ASESORA

Dr. José Carlomán Herrera Ramírez

ASESOR

Mexica, Baja California, México

Diciembre 2016

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto por la oportunidad de ser su tutorado, por todo su apoyo y por compartir un poco de su gran conocimiento. Por enseñarme a ver que todo tiene un lado positivo y que un resultado negativo sigue siendo un resultado.

Al cuerpo académico de Salud Animal, Dra. Sawako Oshima, Dr. José Carloman Herrera y en especial al Dr. Gilberto López Valencia, por su calidad profesional y humana y por transmitir siempre su energía positiva, dentro y fuera del ámbito académico.

A los alumnos prestadores de servicios, a los de ayudantías, y sobre todo a los compañeros de posgrado por todo su apoyo, por su amistad sincera y por compartir sus conocimientos y experiencias.

A toda la familia López Urquidez, especialmente a Francisco Agustín y Marisela Núñez López, por brindarme todo su apoyo y hacerme sentir un integrante más de su familia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología “Conacyt” por el soporte económico durante el curso de estos estudios.

DEDICATORIA

A mis tres mujeres maravilla...

Socorro Ruiz Córdova, mi madre. Por su apoyo y su amor incondicional. Por alentarme a volar cada vez más alto y por respaldar mis decisiones. Porque sin ella no sería la persona que soy.

Lucina Córdova de Ruiz, mi abuela. Por el recuerdo de su sonrisa y por la calidez de sus abrazos, que irán conmigo hasta volvernos a encontrar aunque sea en sueños.

Alejandra López Ruiz, mi hermana. Por ser mi mejor amiga, mi cómplice y mi apoyo incondicional.

RESUMEN

S. aureus es el patógeno más común causante de la mastitis bovina. Expresa un alto número de factores de virulencia y genes de resistencia que varían entre las cepas, potencialmente asociados con el establecimiento y la patogénesis de la inflamación intra mamaria. Se ha demostrado resistencia a los antibióticos de uso más frecuentemente como son: beta-lactámicos, aminoglucosidos, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos y estreptograminas. Numerosos genes asociados con la resistencia a estos antimicrobianos han sido identificados y caracterizados en aislados de *S. aureus*, principalmente: *mec A* (methicilina), *aacA-D* (aminoglucosidos), *tet K*, *tet L*, *tet M* (tetraciclinas), *ermA*, *ermB*, *ermC* (macrólidos-lincosamidas-estreptogramina B), *mrsA* (macrólidos), *linA* (lincosamidas) y *blaZ* (beta-lactamicos). Múltiples pruebas para la medición de resistencia fenotípica han sido desarrolladas, la Prueba de Concentraciones Mínimas Inhibitorias es un método cuantitativo que nos permite conocer la dosis a la que las bacterias son inhibidas in vitro, además de monitorear el efecto de los tratamientos con antimicrobianos. En el presente estudio se seleccionaron 49 aislados de *S. aureus* provenientes de hatos lecheros de la Península de Baja California con perfiles de resistencia diferentes. Se determinó la sensibilidad de los antimicrobianos usados con mayor frecuencia en tratamientos y se realizó la detección de genes por medio de la técnica de PCR. El 44.8% de los aislados fueron susceptibles a todos los antimicrobianos, y el 55.1% mostro resistencia a un tipo de antimicrobiano, de los cuales el 36.7% (18) fueron resistentes a Penicilina G y el 18.3% (9) a Enrofloxina. El gen *gyrA* fue identificado en 100% de los aislados, el gen *blaZ* en 15 (30.6%) aislados y el gen *tetL* en 3 (6.1%). Actualmente se continúa con la detección de los factores de virulencia de estos aislados. Conocer las características de resistencia fenotípica y genotípica de los aislados de *S. aureus*, nos permitirá la optimización del uso de tratamientos terapéuticos con antimicrobianos y así evitar el aumento generalizado de resistencias en la región.

ABSTRACT

S. aureus is the most common pathogen that causes bovine mastitis. It expresses a high number of virulence factors and resistance genes that vary between strains, potentially associated with the establishment and pathogenesis of intra-mammary inflammation. Resistance to commonly used antibiotics has been demonstrated, such as beta-lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones, lincosamides, macrolides and streptogramins. Many genes associated with resistance to these antimicrobials have been identified and characterized in isolates of *S. aureus*, mainly: *mec A* (methicillin), *aacA-D* (aminoglycosides), *tet K*, *tet L*, *tet M* (tetracyclines), *ermA*, *ErmB*, *ermC* (macrolides-lincosamides-streptogramin B), *mrsA* (macrolides), *linA* (lincosamides) and *blaZ* (beta-lactams). Multiple tests for the measurement of phenotypic resistance have been developed, the Test of Minimum Inhibitory Concentrations is a quantitative method that allows us to know the dose at which the bacteria are inhibited in vitro, in addition to monitoring the effect of the antimicrobial treatments. In the present study, 49 isolates of *S. aureus* from dairy herds of the Baja California Peninsula with different resistance profiles were selected. The sensitivity of the most frequently used antimicrobials in treatments was determined and the detection of genes was performed by means of the PCR technique. 44.8% of isolates were susceptible to all antimicrobials, and 55.1% showed resistance to one type of antimicrobial, of which 36.7% (18) were resistant to Penicillin G and 18.3% (9) to Enrofloxacin. The *gyrA* gene was identified in 100% of the isolates, the *blaZ* gene in 15 (30.6%) isolates and the *tetL* gene in 3 (6.1%). Currently the detection of the virulence factors of these isolates is ongoing. Knowing the characteristics of phenotypic and genotypic resistance of isolates of *S. aureus*, will allow us to optimize the use of therapeutic treatments with antimicrobials and thus avoid the generalized increase of resistance in the region.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	li
DEDICATORIA	lii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	ix
INTRODUCCIÓN	1
REVISION DE LA LITERATURA	5
Generalidades de la mastitis	5
Impacto económico	6
Clasificación	8
Etiología	8
Staphylococcus aureus	10
Resistencia a antimicrobianos	14
Características de la resistencia a antimicrobianos de S. aureus	16
Mecanismos de resistencia bacteriana	16
<i>Inactivación enzimática</i>	16

<i>Modificación del sitio diana</i>	16
<i>Alteración de la membrana bacteriana</i>	16
Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)	17
Pruebas de diagnóstico para mastitis	19
Identificación microbiológica de S.aureus	20
Identificación molecular de S. aureus	20
Susceptibilidad antimicrobiana	21
<i>Concentraciones minimas inhibitorias</i>	21
HIPOTESIS	26
OBJETIVOS	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
MATERIAL Y METODOS	28
Ubicación	28
Criterios de inclusión	28
Selección y cultivos de aislados	29
Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	30

Selección de antimicrobianos	30
Preparación de soluciones stock de antimicrobianos	31
Numero de concentraciones en el ensayo	31
Caldo Muller-Hinton con ajuste de cationes (CA-MHB)	33
Preparación y ajuste del inóculo	34
Método de microdilución en caldo	35
validación de la prueba	38
Extracción de ADN bacteriano	39
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
Concentraciones minimas inhibitorias de Staphylococcus aureus	43
Resistencias de Staphylococcus aureus	48
Identificación de genes de resistencia	50
Comparación de resistencia fenotípica y genotípica de S. aureus	52
CONCLUSIÓN	54
LITERATURA CITADA	56

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Titulo	pág.
1	Antimicrobianos utilizados en este estudio	30
2	Concentraciones de antimicrobianos utilizadas en este estudio	32
3	Configuración de placas para cepas control (µg/ml)	36
4	Placas de prueba para aislados de <i>S. aureus</i>	37
5	Lista de oligonucleótidos utilizados en el proyecto	40
6	Condiciones de la reacción de PCR y tamaño de los productos	41
7	Distribución de CMI de los aislados de <i>Staphylococcus aureus</i> (n=49) según su perfil de resistencia previo	47
8	Identificación de genes de resistencia.....	51
9	Comparación de aislados con resistencia fenotípica y detección de genes de resistencia	52

I. INTRODUCCIÓN

La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos, puede ser causada por diferentes patógenos, los cuales logran entrar al canal del pezón y colonizar la glándula mamaria. Puede presentarse de manera clínica o subclínica y puede afectar entre el 20 y el 50% del hato. La inflamación puede ser causada por diversos factores, como trauma en el tejido, mal manejo de ordeño y principalmente varios tipos de bacterias. Las bacterias del genero *Staphylococcus* son consideradas los patógenos más comunes causantes de mastitis en el mundo (El Behiry. A. et al., 2012).

El principal problema ocasionado por este padecimiento es la reducción del volumen de producción y la disminución de la calidad en la leche al aumentar en ella la carga bacteriana (Velasco, 2002). Esta enfermedad representa el 70% de los gastos totales en tratamientos, disminución de la producción y descarte prematuro de ganado, con respecto a los costos de producción. Una prevalencia del 45% de mastitis subclínica, representa en Estados Unidos un costo estimado de 180 a 320 dólares por cada vaca con mastitis al año (Zhao X. Lacasse P. 2007). Mundialmente al año se estiman pérdidas de 35 mil millones de dólares (O'Flaherty et al., 2005. Rabello et al., 2002. Wellemberg, 2002).

Staphylococcus aureus, es un habitante natural de la piel y la mucosa epitelial de humanos y animales, además, al no ser un patógeno obligado de la ubre también puede encontrarse en el suelo, en las máquinas de ordeño y hasta en las manos del personal de ordeña. Es extremadamente versátil y

contagioso, causando un amplio rango de enfermedades y es considerado el agente etiológico más común de la mastitis bovina (De los Santos R., et al. 2014).

S. aureus expresa un alto número de factores de virulencia y genes de resistencia que varían entre las cepas, potencialmente asociados con el establecimiento y la patogénesis de la inflamación intra mamaria (De los Santos R. et al., 2014). La presencia de este microorganismo en el ganado bovino utilizado para la producción de leche destinada a la elaboración de alimentos lácteos para consumo humano, aumenta el riesgo de transmitir clones con resistencia o determinantes de resistencia antimicrobiana de animales a humanos. Así como los humanos también pueden transmitir estas características a los animales durante un mal manejo en el hato (Hata et al., 2010. Sakwinska O. et al., 2011).

El surgimiento de resistencia a los antibióticos en aislados de *S. aureus* provenientes de ganado lechero es una seria preocupación, ya que esto reduce el número de tratamientos disponibles y puede cambiar el espectro de los medicamentos utilizados en la práctica veterinaria. Diferentes tipos de grupos de antimicrobianos son utilizados para el tratamiento de las infecciones de la glándula mamaria. Las cepas de *S. aureus* han demostrado resistencia contra diferentes antibióticos, como son: beta-lactámicos, aminoglucosidos, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos y estreptograminas que son comúnmente usados en veterinaria (Hendriksen RS, et al., 2008).

Las características de resistencia antimicrobiana y de virulencia de este microorganismo pueden ser potenciadas por mutación, evolución clonal, y transferencia horizontal de genes o plásmidos (Jayaraman R. 2009). Los aislados de *S. aureus*, presentan diversos patrones de resistencia antimicrobiana por varios mecanismos, como son, la alteración del sitio diana en el ribosoma, alteración de vías metabólicas, bombas de eflujo, etc. Numerosos genes de resistencia a antimicrobianos han sido identificados y caracterizados en aislados de *S. aureus*, siendo principalmente los genes de resistencia: *mec A* (metecilina), *aacA-D* (aminoglucosidos), *tet K*, *tet L*, *tet M* (tetraciclinas), *ermA*, *ermB*, *ermC* (macrólidos-lincosamidas-estreptogramina B), *mrsA* (macrólidos), *linA* (lincosamidas) y *blaZ* (beta-lactámicos) los que han sido más reportados en la última década en (Ochoa-Zarzosa A, et al., 2008. Wang Y et al., 2008).

El acelerado surgimiento y propagación de cepas de *Staphylococcus spp* y otros grupos de microorganismos patógenos resistentes a antibióticos, es causada por el uso desmedido y poco razonable de terapias químicas, especialmente en las de larga duración con el mismo grupo de antimicrobianos y el uso de estos sin priorizar una prueba de susceptibilidad del factor etiológico responsable de la infección. El uso apropiado de los antibióticos es probablemente el método más simple para reducir el desarrollo del fenómeno de resistencia (Zweda P. et al., 2013).

Debido a la importancia que representa esta problemática y a que se cuenta con información limitada sobre el estado de resistencia genotípica y

fenotípica de los aislados de *S. aureus* en los hatos ganaderos de la Península de Baja California, realza la importancia del uso de pruebas para medir la sensibilidad bacteria y pruebas para identificación de genes.

Conocer las características de resistencia fenotípica y genotípica de los aislados de *S. aureus*, nos permitirá la optimización del uso de tratamientos terapéuticos con antimicrobianos y así evitar el aumento generalizado de resistencias en los hatos de producción lechera de la región.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades de la mastitis

La mastitis bovina es una reacción inflamatoria principalmente causada por diferentes patógenos que logran entrar al canal del pezón y la glándula mamaria. La mayoría de los casos de mastitis bovina se debe a varios tipos de bacterias. Las bacterias del genero *Staphylococcus* son uno de los patógenos más comunes que causan mastitis en el mundo. El género *Staphylococcus* se divide de acuerdo a la prueba de coagulasa en especies coagulasa-negativas (CNS) y coagulasa-positivas (CPS). Históricamente CNS habían sido considerados patógenos de menor importancia que causan infecciones intramamarias (IMI) pero en estudios recientes de prevalencia de mastitis se ha encontrado que CNS pueden ser importantes en algunos países (El Behiry. A. et al. 2012).

Aparte de los problemas de salud de la glándula mamaria, la mastitis también puede causar pérdidas significantes en el rendimiento de la leche, alteraciones en su calidad, problemas de fertilidad y enfermedades sistémicas, en tanto, diversos agentes causantes de mastitis tienen potencial zoonótico por lo que representan un riesgo para la salud de la población humana (Cervinkova D. et al. 2013).

La mastitis ocurre cuando la bacteria es capaz de infectar exitosamente la glándula mamaria. Después de desarrollar mastitis, la probabilidad de una cura exitosa depende de varios factores, como el sistema inmune de la vaca,

las características de virulencia del patógeno y de la eficacia de un buen protocolo de tratamiento. El desarrollo de resistencia a antimicrobianos de los patógenos que causan mastitis es un factor que reduce las probabilidades de cura (Oliveira L. et al. 2012).

Aunque se han identificado cerca de 140 especies de microorganismos como agentes etiológicos de la mastitis bovina, *Streptococcus spp.*, diversos coliformes y *Staphylococcus spp.* son aislados más a menudo. La mastitis causada por *Staphylococcus aureus* se caracteriza por una tasa significativamente baja de cura comparado con infecciones causadas por otros organismos. Este fenómeno es principalmente el resultado de una frecuencia inusual de adquisición de mecanismos de resistencia a antibióticos en este grupo de bacterias y también a su habilidad para formar bio películas. La producción de bio películas es considerada como la principal razón de la recurrencia y la dificultad en la erradicación de infecciones en la glándula mamaria (Szweda P. et al. 2013).

Impacto Económico

La mastitis representa una de las enfermedades más costosas de la industria lechera en el mundo, con pérdidas estimadas de cerca de 2 mil millones de dólares por año solo en Estados Unidos. Esta substancial pérdida económica se debe a varios factores como son el rechazo de la leche por el receptor, la reducción de la calidad de la leche, el costo por medicamentos, servicios veterinarios, sacrificios tempranos y el incremento en los costos de laboratorio (National Mastitis Council, 1996a). Una prevalencia del 45% de mastitis subclínica, representa en Estados Unidos un costo estimado de 180 a

320 dólares por cada vaca con mastitis (Zhao X. Lacasse P. 2007). Mundialmente al año se estiman pérdidas en 35 mil millones de dólares (O'Flaherty et al., 2005. Rabello et al., 2002. Wellemberg, 2002).

Según Acebo (2006), la mastitis es la enfermedad más común y costosa del ganado lechero ya que causa una disminución en la producción láctea de hasta 70% y el precio de venta de la leche se ve afectado debido a la mala calidad de ésta. Las pérdidas por la baja en la producción se deben de tener en cuenta las pérdidas económicas por gastos en medicamentos, servicio veterinario, desecho de animales y problemas de residuos de antibióticos en la leche. Según datos obtenidos por Ávila y Gutiérrez (2004) en un hato del Altiplano de México, los porcentajes de vacas eliminadas a causa de mastitis varían anualmente desde 1.3 hasta 25% lo que impacta directamente en la economía del productor.

La mastitis en México se presenta como en cualquier otro país del mundo, incluyendo los establos tropicales. De acuerdo con investigaciones propias realizadas en el estado de Jalisco y la literatura al respecto, la mastitis subclínica casi alcanza el 50% en los hatos lecheros de México. Esta enfermedad es muy costosa para la industria, el promedio por vaca en México es de \$1,700.00 a \$2,000.00 anuales (Wolter et al., 2004). Así, las pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis subclínica se estiman en varios miles de millones de pesos, siendo críticas en los establos medianos y pequeños (Medina, 2002 y Romero 2004).

Clasificación

La mastitis puede aparecer en forma clínica y subclínica, la última ha sido comúnmente encontrada en la mayoría de los hatos. Es conocida la relación entre el patógeno particular y la presentación de la enfermedad, por ejemplo, *Streptococcus. uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias piogénicas son principalmente consideradas como agentes causales de la mastitis clínica. Por el otro lado, *S. agalactiae*, CNS y *Enterococcus spp.* están asociados con mastitis subclínica. *S. aureus* ha sido designado como agente causal tanto de mastitis clínica como subclínica (Awale et al. 2012).

A diferencia de la forma clínica de esta enfermedad, la mastitis subclínica es difícil de reconocer y por esta razón, puede causar pérdidas significantes en la producción de leche. Por otra parte, las vacas subclínicamente infectadas pueden representar una fuente de patógenos particulares que se pueden propagar por vía de los sistemas automáticos de ordeña, por lo que evaluar la prevalencia e identificar las vacas infectadas subclínicamente es importante ya que son una fuente potencial de patógenos causantes de mastitis (Cervinkova D. et al. 2013).

Etiología

Numerosos microorganismos han sido descritos como agentes causales de la mastitis bovina. De acuerdo con su epidemiología, los patógenos de la mastitis pueden dividirse en, contagiosos y ambientales. El principal reservorio de un patógeno contagioso son las ubres infectadas, mientras que un ambiente contaminado es el principal reservorio de patógenos ambientales que pueden

provocar mastitis. *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y *Mycoplasma spp.* son considerados como patógenos contagiosos típicos. Patógenos ambientales típicos son *Streptococcus uberis*, enterobacterias y estafilococos coagulasa negativos (CNS). *Streptococcus dysgalactiae* ha sido comúnmente descrito como un patógeno contagioso, pero también puede comportarse como un patógeno ambiental, así mismo, se han reportado en algunas ocasiones infecciones contagiosas por CNS. Otros patógenos como *Pseudomonas spp.*, y bacterias de la familia *Pasteurellaceae*, algunos piogénicos, bacterias anaerobias, levaduras y microalgas se numeran entre aquellos que no ocurren frecuentemente. Actualmente en la Republica Checa, existe una clara evidencia de un incremento en la incidencia de mastitis ambiental, mientras que la incidencia de mastitis contagiosa ha disminuido (Cervinkova D. et al. 2013).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus es un habitante natural de la piel y la mucosa epitelial de humanos y animales. Es extremadamente versátil y causa una amplio rango de enfermedades y es el agente etiológico más común de la mastitis bovina contagiosa. Esta bacteria expresa un alto número de factores de virulencia que varían entre las cepas, potencialmente asociados con el establecimiento y patogénesis de la inflamación intramamaria (IMI) (De los Santos R. et al. 2014).

S. aureus es conocido por ser altamente contagioso, y se puede diseminar dentro de un hato de vaca a vaca durante el proceso de ordeña, ya sea por maquinaria, el equipo en mal estado o las manos contaminadas del

ordeñador. La presencia de este patógeno en alimentos de origen animal o leche aumenta debido a la transmisibilidad de clones con resistencia a antimicrobianos y el riesgo de transmisión de animales a humanos o viceversa (Sakwinska O. et al. 2011).

S. aureus, se encuentra dentro de los aislados de especies coagulasa positivos (CPS) de los casos de mastitis. Se considera que en el mundo este patógeno es la causa más común de mastitis bovina y es responsable por el 25-30% de los casos de infección intramamaria en los Estados Unidos. La mastitis causada por *S. aureus* es más frecuentemente subclínica, sin embargo, altas tasas de incidencia de mastitis clínica están asociadas con este microorganismo (El Behiry A. et al. 2012).

Staphylococcus aureus puede expresar una amplia colección de factores de virulencia, incluyendo proteínas de superficie que promueven la adherencia al tejido dañado, exotoxinas y enzimas que pueden causar una variedad de patologías en la piel y tejidos blandos, incluyendo inflamación intra mamaria (Delgado, S. et al. 2011).

Resistencia a antimicrobianos

La resistencia a antibióticos es el mayor desafío de la profesión médica en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. La resistencia ha sido documentada no solamente contra antibióticos de origen natural y de origen semi sintéticos, sino que también se ha reportado contra compuestos puramente sintéticos (como las fluoroquinolonas). El amplio rango de la aparición de resistencia antimicrobiana sugiere que, en un principio, cualquier organismo puede desarrollar resistencia a cualquier antibiótico. El fenómeno de

la transferencia horizontal de genes aumenta el problema facilitando una rápida dispersión de la resistencia a los antibióticos. Desafortunadamente, el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos no ha disminuido la emergencia de resistencia a estos antibióticos (Jayaraman, R. 2009). El uso clínico de los antimicrobianos ha mitigado el sufrimiento y ha salvado millones de vidas de pacientes de ciertas enfermedades mortales. A demás ha provocado un desarrollo sin precedentes de la industria farmacéutica y de cuidados de salud. Sin embargo, esto ha traído consecuencias que no se anticiparon y que no son deseables, como son la emergencia y expansión de la resistencia antimicrobiana, que impide la eficacia de los tratamientos, eleva los costos y frecuentemente resulta en tratamientos fallidos. Mientras más y más antibióticos van siendo descubiertos, la resistencia también va incrementando. Uno de los problemas más preocupantes es el fenómeno de la multi droga resistencia (MDR).

La resistencia a antimicrobianos se define como la capacidad de una bacteria de sobrevivir a la exposición de una concentración conocida del agente antimicrobiano a la que solía ser sensible (Oliveira L. 2012). La mayoría de la literatura sobre la aparición y propagación de la resistencia a antibióticos de bacterias en animales está relacionada con los riesgos de transmisión a humanos, y a su posible impacto en la salud pública y en la economía. Existe una amplia evidencia de que bacterias resistentes como, *Salmonella*, *Campylobacter* y methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pueden propagarse entre animales y humanos. También hay evidencia circunstancial de que genes de resistencia como el genes *vanA*, confiere resistencia a las más

altas generaciones de cefalosporinas y puede propagarse en bacterias que colonizan a los animales y en aquellas que colonizan personas (Bengtsson B. and Greko C. 2014). Esta resistencia puede ser intrínseca o adquirida. La intrínseca es propia de cada familia, género o especie de organismo patógeno, siendo por lo tanto una resistencia predecible, que la bacteria es resistente a determinado antibiótico debido a que no tiene la estructura blanco o el antibiótico es incapaz de penetrar la célula bacteriana. La resistencia adquirida es cuando la bacteria sensible a un antibiótico particular se convierte en resistente ya sea por mutaciones cromosómicas, o por intercambio de material genético entre bacterias (Hernández, 2005)

El uso de agentes antimicrobianos en las granjas lecheras así como en otros sistemas de producción de alimentos de origen animal es la principal preocupación por la emergencia de bacterias patogénicas resistentes y zoonóticas. Aunque diferentes clases de drogas son utilizadas en el manejo de salud animal y en medicina humana, la resistencia selectiva a una clase de droga puede dirigir la conversión de resistencia a otra. Los antibióticos son utilizados para lograr la disminución de la, mastitis subclínica y como preventivos en el periodo seco. Monitorear la presencia de patógenos resistentes en los animales es importante particularmente para aquellos con potencial zoonótico (Haran K. et al. 2011).

La dramática propagación de *Staphylococcus spp.* resistentes a antibióticos y también otros grupos de microorganismos, es causada por el uso desmedido y poco razonable de terapias químicas, especialmente las terapias de larga duración con el mismo grupo de antibióticos y el uso de estos sin

priorizar un ensayo de la susceptibilidad del factor etiológico responsable de la infección. Un uso apropiado de los antibióticos es probablemente el método más simple para reducir el desarrollo del fenómeno de resistencia (Szweda P. et al. 2013).

La propagación de resistencia a antibióticos por especies CNS en el ganado, puede representar un peligro para la salud humana debido a la posible transferencia de genes de resistencia entre especies de *Staphylococcus* y mediante la transmisión directa de patógenos resistentes entre humanos y animales (Kot B. et al. 2012). La aparición de resistencia a antibióticos en casos de mastitis en vacas lecheras con *S. aureus* es preocupante ya que disminuye las posibilidades de tratamientos y cambia el espectro de los antibióticos usados en medicina veterinaria. Diferentes grupos de antibióticos son usados para el tratamiento de infecciones en la glándula mamaria y consecuentemente se ha observado resistencia contra diferentes antibióticos como beta-lactámicos, aminoglicósidos, fluoroquinolonas, lincosamidas, macrólidos y estreptograminas que son comúnmente usados por médicos veterinarios (Kumar R. et al. 2010).

Una bacteria puede ser intrínsecamente resistente a una clase específica de antimicrobianos debido a la falta de sitios de enlace o debido a otra característica farmacológica, o la bacteria puede adquirir resistencia a los antimicrobianos por mutaciones en sus genes cromosomales, o por el intercambio de material genético por vía plásmidos o transposones (Oliveira L. et al. 2012).

Los patógenos multidroga-resistentes (MDR), se definen como la resistencia de un patógeno a 3 o más clases de antimicrobianos. Monitorear el desarrollo de patógenos MDR es importante porque las infecciones con bacterias resistentes minimizan las opciones terapéuticas, incrementan el costo de los cuidados de salud y pueden contribuir al incremento de morbilidad y mortalidad. Otra posible consecuencia del desarrollo de patógenos MDR en la agricultura es la posibilidad de transferir esos genes de multi resistencia a la microbiota humana (Oliveira L. et al. 2012).

Características de la resistencia a antimicrobianos de *S. aureus*

Una cantidad considerable de literatura detalla la respuesta bacteriana a factores de estrés subletales como calor, frío, pH, exposición a desinfectantes, etc. Se ha demostrado que el estrés induce cambios genotípicos y fenotípicos en la bacteria. McMahon et al. (2007) reporta que en condiciones con niveles subletales de estrés se afectan los niveles de resistencia a antibióticos de patógenos transmitidos por alimentos, lo cual indica que las células de *S. aureus* que fueron sometidas a un estrés calórico de 45°C mostraron una baja en la concentración mínima inhibitoria para los antibióticos examinados. Por otro lado las bacterias que fueron sometidas a un nivel subletal de NaCl (4.5%) o un ácido (pH 5.0) la concentración mínima inhibitoria (MIC) contra gentamicina y eritromicina fue más alta. De acuerdo con estos hallazgos, el uso de desinfectantes en granjas lecheras puede afectar el desarrollo de resistencia a antibióticos en las bacterias (Onur Z. R. et al. 2013).

Las *características* de la resistencia a antibióticos y la virulencia de *S. aureus* pueden ser aumentadas por mutaciones, evolución clonal y por

transferencia horizontal de genes y plásmidos. Las cepas de *S. aureus* se diversifican en cuanto a la resistencia a antibióticos por varios mecanismos como alteración del sitio objetivo en el ribosoma, alteración en la vía metabólica, bombas de eflujo y la modificación enzimática de antibióticos. Numerosos genes para la resistencia de antibióticos han sido identificados y caracterizados en cepas de *S. aureus*, como los genes para la resistencia a meticilina (*mecA*), aminoglicósidos (*aacA-D*), tetraciclina (*tetK*, *tetM*), macrolido-lincosamida-streptogramina B (*ermA*, *ermB*, *ermC*), macrólidos (*msrA*) y lincosamidas (*linA*) (Kumar R. 2010).

La resistencia de *S. aureus* a penicilina (PEN) esta cercanamente asociada con el gen *blaZ* que codifica para la B-lactamasa. La resistencia a eritromicina (ERY) es predominantemente mediada por una metilasa mediada por los genes *erm*. La resistencia a tetraciclinas (TET) en estafilococos es conferida por dos mecanismos diferentes: flujo de salida activo de la droga y protección del sitio objetivo de las TET, ambos mecanismos son determinados por los genes *tet*. Como los genes *tet K* y *tet L tet M* que son los que más comúnmente confieren la resistencia a tetraciclinas en *S. aureus* (Gao J. et al. 2011).

La capacidad de formación de biopelículas en *S. aureus* es considerada un factor de virulencia importante en la mastitis bovina. La habilidad de *S. aureus* de adherirse al epitelio de la glándula mamaria y la facilidad para formar biopelículas es persistente en el hospedador debido a la mala respuesta inmune y al incremento en la tolerancia a los antimicrobianos (Cervinkova D. et al. 2013).

Mecanismos de resistencia bacteriana

Inactivación enzimática

Consiste en la síntesis de ciertas enzimas que modifican la estructura del antibiótico provocando la anulación de su función (adenilación, acetilación, fosforilación o hidrólisis). El ejemplo más típico es el de la producción de β -lactamasas capaces de abrir el anillo β -lactámico que es la estructura funcional de la familia de los antibióticos β -lactámicos hidrolizándolo y produciendo ácido peniciloico que carece de actividad antibacteriana (Gimeno y Ortega, 2005).

Modificación del sitio diana

En este mecanismo de resistencia se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, o las subunidades ribosomales 50S Y 30S, entre otros, debido a mutaciones espontaneas ocurridas en los genes que codifican al sitio blanco de acción del antibiótico, como la ARN polimerasa, el ARN ribosomal 16S, las PBP y la AND girasa (Ferrer y Lemmis, 2006).

Este mecanismo tiene efectos sobre los antibióticos macrólidos y lincomicinas interviniendo la subunidad 50S y con los aminoglucosidos de la subunidad 30S (Martin y Luas, 1989). Los cambios en el sitio blanco donde el medicamento actúa, interfieren y limitan la interacción, evitan la acción bacteriostática/bactericida y promueven la resistencia antimicrobiana (Yoneyama y Katsumata, 2006)

Alteración de la membrana bacteriana

Las bacterias pueden generar cambios en la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua y se

encuentran en la membrana externa y regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos tales como los betalactámicos y aminoglucósidos, los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico. En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa (bombas de eflujo), impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente (Daza, 1998 y Villa et al., 2007).

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Staphylococcus aureus sigue siendo uno de los microorganismos más significantes asociados con la mastitis bovina en el mundo. El aislamiento de MRSA de animales fue reportado por primera vez en 1972, y aunque desde entonces ha sido ocasionalmente reportado, su presencia en la leche y el ambiente de las granjas posee un riesgo potencial para los trabajadores, veterinarios y animales de la granja que estén expuestos al ganado infectado (Haran K. et al. 2011)

Los MRSA han sido tradicionalmente considerados patógenos de hospital y adquiridos en comunidades humanas, sin embargo, estudios recientes han reportado incidencias de MRSA en casos de mastitis. Las cepas de MRSA son consideradas por ser resistentes a muchos agentes antibióticos, poseen también una variedad de otros genes de resistencia que les confieren resistencia a la mayoría de los antimicrobianos disponibles. Los aislados de MRSA de origen animal son resistentes a penicilina y ampicilina pero más susceptibles a eritromicina, gentamicina o kanamicina. La penicilina es el antimicrobiano más extensamente usado como primera opción de tratamiento

contra mastitis; varias clases de antimicrobianos son usadas como alternativa, incluyendo penicilinas penicilasa resistentes, cefalosporinas, macrólidos, aminoglicósidos, tetraciclinas, lincosamidas e inhibidores del metabolismo de los folatos (Intrakamhaeng M. y Komutarin T. 2012).

En las últimas cinco décadas *S. aureus* methicillin-resistant (MRSA) se ha propagado como un patógeno adquirido en hospitales humanos (HA-MRSA), a nivel mundial. Recientemente han emergido MRSA comunitarias (CA-MRSA) y otros MRSA están asociados con el ganado (LA-MRSA). El reporte de aislados en ganado (como cerdos, vacas y aves de corral) de MRSA ha ido aumentando, y el riesgo zoonótico de transmisión a humanos ya ha sido demostrado. De hecho, MRSA ST398, el clon prototipo de LA-MRSA ya fue encontrado en humanos que se mantienen en contacto directo con los animales (veterinarios y granjeros) (Bardiau M. et al. 2013).

Estas bacterias también causan otro tipo de enfermedades animales incluidas septicemia e infecciones de heridas, huesos y articulaciones. Las infecciones por MRSA pueden ser transferidas entre humanos y animales, sin embargo la presencia en infecciones de animales ha sido raramente reportada. Los reportes de incidencia se han ido presentando con más y más frecuencia en la actualidad (Turkylmaz S. et al. 2009).

La resistencia a meticilina es causada por el gen *mecA*, que codifica la proteína que se fija a la penicilina con menos afinidad por antibióticos b-lactámicos. Las cepas de MRSA deben ser consideradas resistentes a todas las penicilinas, cefalosporinas y otros B-lactámicos como ampicilina-sulbactam, amoxicilina-ácido clavulanico, ticarcilina-ácido clavulanico, piperacilina-

tazobactam y los carbapentanos, según los resultados obtenidos con esos agentes en pruebas in vitro. Estos organismos también son frecuentemente resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos comúnmente usados, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclinas y fluoroquinolonas (Turkylmaz S. et al. 2009).

La evolución de la resistencia a antibióticos en cepas de *S. aureus*, es una causa seria de preocupación en animales lecheros. Las cepas resistentes a antibióticos del grupo B-lactámicos se conocen como MRSA, estas cepas se diseminan dentro de la glándula mamaria y a menudo producen severas infecciones que son incurables dentro del hato (Kumar R. et al. 2011).

El uso descontrolado de antibióticos que causan selección de clones resistentes bajo presión de antibióticos pueden ser la razón para la propagación de la multirresistencia. Las cepas de MRSA aisladas en hospitales son a menudo resistentes a múltiples drogas incluyendo, eritromicina, clindamycina, tetraciclina, gentamicina y ciprofloxacina (Turkyilmanz S. et al. 2009).

Pruebas de diagnóstico para mastitis

El diagnóstico temprano de la mastitis bovina es de suma importancia y los métodos de diagnóstico han sido desarrollados para monitorear la calidad de la leche a través de variaciones que sugieran la inflamación de la glándula mamaria así como la presencia de sus posibles patógenos causales. Los diferentes métodos consisten en pruebas físicas, químicas y microbiológicas aplicadas a la leche, ya sea de cada cuarto o a la leche en tranque. Entre los métodos más utilizados son el diagnóstico observacional que se basa en la identificación de diferentes señales clínicas, como son inflamación, dolor al

tacto, fiebre, depresión y reducción de la producción láctea (Castro et al. 2006), así como los métodos indirectos entre los que destacan principalmente el conteo de células somáticas en leche y la prueba de California (CMT).

Identificación microbiológica de *S. aureus*

S. aureus es una bacteria intracelular de forma esférica de aproximadamente 0.8 micrómetros de diámetro, Gram positivo, con agrupación en racimos, de ahí su nombre que proviene del griego “Staphylo” que quiere decir “en racimo de uvas”. Esta bacteria es inmóvil, no esporulada y generalmente no posee cápsula (Ávila y Gutiérrez 2004). Se identifica con las pruebas de la coagulasa, manitol y termonucleasa, para las cuales es positivo. Uno de los mecanismos que utiliza para tener éxito es la capacidad para invadir el epitelio mamario bovino, internalizarse y sobrevivir dentro de él (Buzzola et al., 2007).

La identificación microbiológica de las colonias de *S. aureus* se puede basar en pruebas bioquímicas estandarizadas que incluyen, tinción de Gram, morfología de la colonia, prueba de catalasa y prueba de coagulasa (Intrakamhaeng M. y Komutarin T. 2012). Siendo *S. aureus* una bacteria con las siguientes características, Gram-positivo, catalasa-positivo, coagulasa-positivo, oxidasa-negativo, bacitracin-resistente, hemolítico, productor de acetona-positivo, B-galactosidasa-negativa, fermentador de manitol y polimyxin B-resistente (Turkyilmanz S. et al. 2009).

Identificación molecular de *S. aureus*

Técnicas de identificación molecular han sido desarrollados para los estudios epidemiológicos de *Staphylococcus aureus*, debido a que el cultivo

microbiológico de las muestras clínicas, solo ofrecen resultado en un 50% de los casos (Koskinen et al., 2009). La principal es la reacción en cadena de polimerasa (PCR), ya que la sensibilidad y especificidad de esta prueba es generalmente mayor que el aislamiento (Cremonesi et al., 2016. Park et al., 2006). La aplicación de esta técnica, con un formato sencillo y rápido, es adecuada para la rutina diaria de un laboratorio de microbiología y contribuye a obtener diagnósticos con mayor velocidad. Sin embargo, la especificidad y la sensibilidad de los cebadores para el diagnóstico del patógeno deben ser validados (Koskinen et al., 2009). Actualmente se han publicado diversos tipos de cebadores para la amplificación de diversos genes y regiones del genoma de *S. aureus*.

Susceptibilidad antimicrobiana

Concentraciones mínimas inhibitorias

La Concentración mínima inhibitoria (MIC), en microbiología, es la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento de un microorganismo detectado a simple vista después de su periodo de incubación. La concentración mínima inhibitoria es importante en diagnóstico de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos. Las concentraciones mínimas inhibitorias pueden ser determinadas mediante métodos de microdilución en caldo, normalmente siguiendo las directrices de centros de referencia tales como el CLSI (Clinical Laboratory Institute Standards), BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) o EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility

Testing). En medicina, la concentración mínima inhibitoria no sólo se usa para determinar la concentración del antimicrobiano que recibirá el paciente sino también el tipo de antimicrobianos a utilizar, lo que a su vez reduce la probabilidad de resistencia microbiana a agentes antimicrobianos específicos (Andrews J. M. 2001).

Turkyilmanz S. et al. (2009) en Turquía encontraron 16 cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilin-resistentes de un total de 93 cepas de *Staphylococcus aureus* examinandas. Las cepas fueron sometidas a prueba de concentración mínima inhibitoria en diluciones de agar, encontrando los siguientes resultados: para vancomicina los MICs fueron, para dos cepas 1µg/ml, para otras siete 2µg/ml y para las últimas siete 4µg/ml, clasificando 9 de las cepas como susceptibles y las 7 restantes con resistencia intermedia. Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) a las que las cepas fueron sometidas fueron las siguientes: todas las cepas tuvieron MIC >128µg/ml para eritromicina y clindamicina indicando resistencia a estos antimicrobianos. 15 cepas fueron resistentes a tetraciclina con MIC >128µg/ml. Para cloranfenicol MIC 16µg/ml indicando una resistencia intermedia. 12 cepas fueron resistentes a ciprofloxacina con concentraciones variables, (1 cepa MIC 8µg/ml, 4 cepas MIC 16µg/ml, 4 cepas MIC 32µg/ml y 3 cepas MIC 64µg/ml). 2 cepas mostraron resistencia media y las otras 14 cepas fueron resistentes a gentamicina en concentraciones variables (2 cepas MIC 8µg/ml, 5 cepas MIC 16µg/ml, 5 cepas MIC 32µg/ml y 6 cepas MIC 64µg/ml). Del total de seis antibióticos, se detectó que 10 cepas fueron resistentes a eritromicina, clindamicina, ciprofloxacino, tetraciclina y gentamicina, de las cuales 5 presentaron susceptibilidad a

vancomicina. En este experimento también se estudió la presencia de genes de resistencia conocidos, de las cepas resistentes a tetraciclinas 15 tenían el gen *tet(M)* y una tenía el gen *tet(K)*. De las cepas resistentes a eritromicina 9 tenían el gen *erm(A)* y siete tenían los genes *erm(A)* y *erm(B)*. La resistencia a gentamicina se relacionó con la presencia de gen *aac(6)-aph(2)* en los 14 aislados resistentes.

En Wisconsin, Oliveira L. et al. (2012), obtuvieron 116 aislados (58 de mastitis clínica y 58 de mastitis subclínica) para determinar la distribución de los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias y hacer una comparación entre las cepas obtenidas de ambos tipos de mastitis. Encontraron que todos los aislados fueron inhibidos por la concentración probada para ceftiofur $MIC \leq 2.0$ y para oxaciclina $MIC \leq 0.5$. Las concentraciones más altas para eritromicina no inhibieron el crecimiento del 6.9% del total de los aislados obtenidos de casos clínicos. Las concentraciones más altas de enrofloxacin, sulfadimetoxacina y tetraciclina no inhibieron el crecimiento de 1.7, 1.7 y 10.6% respectivamente, del total de aislados obtenidos de casos subclínicos. Las concentraciones MIC_{50} y MIC_{90} para ampicilina, ceftiotur, cefalotina, enrofloxacin, oxaciclina, penicilina-novobiocina y spiramicina se encontraban dentro del rango de una sola dilución entre ellas. La diferencia más grande entre el rango de diluciones entre el MIC_{50} y el MIC_{90} fue para penicilina, que mostró en casos subclínicos un MIC_{50} de 0.02µg/ml y un MIC_{90} de 0.25µg/ml. La MIC_{90} para tetraciclina y pirlimicina fue menos concentrada en aislados obtenidos de casos subclínicos que la de aquellos obtenidos en casos clínicos de mastitis. En el mencionado estudio llegaron a la conclusión de que la

sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* relativa a las concentraciones mínimas inhibitorias, en los dos tipos de casos (clínica y subclínica) era heterogénea para ceftiotur, cefalotina, y eritromicina. Una mayor proporción de los aislados obtenidos de casos subclínicos fueron inhibidos a la misma concentración en comparación con los aislados obtenidos de casos clínicos en los cuales hubo variación.

Cervinkova, D. et al. (2013) sometieron muestras de 16 granjas lecheras de la Republica Checa a pruebas para identificar cepas de *Staphylococcus aureus* en casos de mastitis subclínica. Se aislaron 65 cepas que fueron probadas para medir las concentraciones mínimas inhibitorias de los 13 agentes antimicrobianos utilizados más a menudo en tratamientos terapéuticos en ese país (ampicilina, ampicilina/sulbactam, cloxacilina, gentamicina, cotrimoxazol, tetraciclina, clindamicina, neomicina, tilosina, cefalotina, cefotaxima, Norfloxacin y vancomicina) y determinar la prevalencia de resistencia existente. En general, los aislados de *S. aureus* fueron susceptibles a la mayoría de los antibióticos probados. Las concentraciones mínimas inhibitorias en esta prueba fueron las siguientes: ampicilina MIC $\geq$ 1.0 μ g/ml, ampicilina/sulbactam MIC $\leq$ 0.5, cloxacilina MIC $\leq$ 0.25, gentamicina MIC $\leq$ 1.0 μ g/ml, cotrimoxazol MIC $\leq$ 1.0 μ g/ml, tetraciclina MIC $\geq$ 16.0 μ g/ml, clindamicina MIC $\leq$ 0.125 μ g/ml, neomicina MIC $\leq$ 1.0 μ g/ml, tilosina MIC $\leq$ 2.0 μ g/ml, cefalotina MIC $\leq$ 0.5 μ g/ml, cefotaxima MIC $\leq$ 1.0, norfloxacin $\geq$ 8 μ g/ml, y vancomicina MIC $\leq$ 1. La resistencia a ampicilina fue la más frecuentemente observada (18 aislados) y representa el 27.7%, mientras que la resistencia a otros antibióticos fue esporádica y se observó solo en tetraciclinas (7 aislados) y

en norfloxacin (3 aislados). Nueve aislados mostraron una resistencia intermedia a norfloxacin. La resistencia a 2 clases de antibióticos se encontró en 4 aislados y a tres clases de antibióticos en solo un aislado. No se observó resistencia a eritromicina, ni clindamicina. Todos los aislados fueron sensibles a cefoxitina. Por tanto, concluyeron que los aislamientos no albergaban ninguna resistencia a macrólidos, lincosamidas, estreptograminas B ni a meticilina

III. HIPÓTESIS

Diferentes aislados de *Staphylococcus aureus* provenientes de casos de mastitis bovina en establos de la península, presentan diferentes patrones de resistencia debido a sus variaciones genéticas.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar in vitro la resistencia a los antibióticos más utilizados en los establos de la región e identificar la presencia de genes de resistencia asociados, en diferentes aislados de *Staphylococcus aureus* provenientes de hatos lecheros de la península de Baja California.

Objetivos específicos

- Determinar las concentraciones mínimas de los antibióticos a las cuales los aislados de *S. aureus* son inhibidos, mediante la prueba de micro diluciones en caldo.
- Caracterizar genéticamente los aislados de *S. aureus* para detectar los genes de resistencia presentes en estas bacterias.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicado en la ciudad de Mexicali. Se utilizaron aislados obtenidos de casos de mastitis de establos lecheros comerciales orientados a la producción de leche y a la producción de subproductos lácteos ubicados en la península de Baja California. Los establos muestreados cuentan con una estructura de producción semitecnificada y fueron los siguientes: dos establos ubicados en la ciudad de Mexicali, uno en la zona del Florido en el municipio de Tecate, uno en la zona de Ojos Negros en el municipio de Ensenada, Uno más en La Paz Baja California Sur y otro en Ciudad Constitución, también Baja California Sur.

Criterios de inclusión

Se incluyeron aislados de *S. aureus* que mostraron diferentes patrones de resistencia, previamente sometidos a pruebas de identificación microbiológica (tinción de Gram +, prueba de Catalasa +, prueba de DNAsa +, prueba de Coagulasa +), confirmados molecularmente mediante PCR utilizando los oligonucleótidos F-Sau 327 (5'-GGA CGA CAT TAG ACG ATT CA-3') y R-Sau 1645 (5'-CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT-3') según la técnica descrita por Riffon (2001); y con perfil de resistencia a antimicrobianos utilizando el

método de difusión en multidiscos Gram positivos, utilizando Agar Muller-Hinton chocolate BD Bioxon y los siguientes antibióticos y concentraciones: ampicilina 10 µg, dicloxacilina 1µg, penicilina 10 U, cefalotina 30µg, cefotaxima 30µg, cefuroxima 30µg, ceftazidima 30µg, eritromicina 15µg, gentamicina 10µg, pefloxacina 5µg, tetraciclina 30µg, trimetoprim-sulfametoxazol 25µg (BIO-RAD inc).

Selección y cultivo de aislados

De los aislados de *S. aureus* almacenados en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la UABC fueron seleccionados 49, de los cuales 26 tienen patrones de resistencia a una o dos familias de antimicrobianos y 23 mostraron ser multidroga resistentes.

De las alícuotas originales guardadas con glicerol al 10% a -80°C se realizaron resiembras en caldo de cultivo Todd Hewitt y se incubaron a 35°C por un periodo de 24 horas, para descartar contaminaciones y obtener cultivos nuevos. Posteriormente se tomaron 857µl del caldo y 143µl de glicerol al 70% que se almacenaron en tubos eppendorf por duplicado a -20°C para su utilización en los experimentos de este proyecto.

Se utilizaron las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, la cual cuenta con los genes de resistencia mec A, bla Z, gyr A, tet K, tet M y ermA y la cepa *Staphylococcus aureus* BAA-1026 que tiene los genes mec A, gyr A, erm A, como cepas controles para las pruebas realizadas en este proyecto de investigación.

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los antimicrobianos a los que los aislados fueron sometidos se utilizó el método de microdiluciones en caldo. Se utilizó el procedimiento establecido por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio documento CLSI M07-A10 (2015) y el complemento M100-S24 (2014).

Selección de antimicrobianos

Para seleccionar los antibióticos utilizados en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de este proyecto, se visitaron los establos lecheros para conocer cuáles eran los que son utilizados principalmente para el tratamiento de diversos padecimientos del ganado bovino. También se tomaron en cuenta los resultados de resistencia que los aislados presentaron en la prueba de difusión en multidisco previamente aplicado.

Cuadro 1.- Antimicrobianos utilizados en este estudio.

Familia	Antimicrobiano
Aminoglucósidos	Gentamicina
Betalactámicos	Penicilina G procaínica
Cefalosporinas	Ceftiofur
Fluoroquinolonas	Enrofloxacina
Macrólidos	Tilosina
Sulfonamidas	Trimetoprim/Sulfametoxazol
Tetraciclinas	Oxitetraciclina

Preparación de soluciones stock de antimicrobianos

Siguiendo las especificaciones del manual M100-S24 del CLSI se realizaron los cálculos y se utilizaron los diluyentes señalados para cada antimicrobiano.

- Se realizaron los cálculos para las concentraciones de al menos 1,000µg/ml o 10 veces la concentración más alta que fue evaluada.
- Las soluciones fueron preparadas ascépticamente en un volumen final de 20ml usando materiales estériles y dentro de una campana de flujo laminar.
- Se repartieron 1.5ml de cada solución dentro de micro tubos de 1.6ml estériles y se sellaron con para film.
- Los viales fueron almacenados a temperaturas bajas, nunca por arriba de los -20°C hasta su uso.
- Los micro tubos fueron descongelados según fueron requeridos para su uso, y se descartó cualquier sobrante al final del día.
- Cualquier deterioro en la actividad de alguno de los antimicrobianos se reflejó en los resultados de las pruebas control.

Número de concentraciones en el ensayo

Las concentraciones de cada agente antimicrobiano fueron determinados utilizando los puntos de interpretación en la tabla 2C del manual M100-S24 y las diluciones finales fueron preparadas según las especificaciones de la tabla 8A del mismo documento.

En las cepas control se utilizaron 12 concentraciones de cada antimicrobiano para garantizar la calidad de la acción de los antimicrobianos y para estandarizar la prueba.

Cuadro 2.- Concentraciones de antimicrobianos utilizadas en este estudio.

Antimicrobiano	Concentraciones en µg/ml
Ceftiofur	256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125
Enrofloxacin	256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125
Gentamicina	256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125
Oxitetraciclina	256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125
Penicilina G procaínica	128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625
Tilosina	256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125
Trimetoprim/ sulfametoxazol	125/625, 62.5/312.5, 31.25/156.25, 15.62/78.12, 7.81/39.06, 3.90/19.53, 1.95/9.76, 0.97/4.88, 0.48/2.44, 0.24/1.22, 0.12/0.61, 0.06/0.30

Ya que la prueba no exige un número determinado de concentraciones y para maximizar el uso del material y de los reactivos disponibles determinamos que serían probadas 6 concentraciones de cada antimicrobiano en las pruebas

que se realizaron a los aislados de *S. aureus* teniendo en cuenta los puntos de quiebre establecidos en los manuales para cada agente antimicrobiano.

Caldo Muller-Hinton con Ajuste de Cationes (CA-MHB)

El Caldo Mueller-Hinton es el medio recomendado para las pruebas de susceptibilidad, ya que muestra buena reproducibilidad entre lotes y es bajo en inhibidores que afectan los resultados en las pruebas de susceptibilidad para algunos antimicrobianos como sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas.

Se requirió ajustar la cantidad de cationes en el caldo para alcanzar una concentración de 20 a 25mg de Ca^{++}/L y de 10 a 12.5mg de Mg^{++}/L , siguiendo las indicaciones del manual mencionado. Para las soluciones se utilizó agua desionizada en volúmenes finales de 100ml, se esterilizaron con membranas de filtración (0.2 μm polyethersulfone membrana whit polypropylene housing, GE Healthcare Life Sciences WhatmanTM), y se depositaron directamente en tubos de polipropileno de 50ml estériles para almacenar, se sellaron con papel parafilm y se dejaron en refrigeración entre 2 y 8°C durante la noche antes de ser utilizados.

Según el fabricante del medio de cultivo (Muller-Hinton Broth DIFCO 275730) se suspendieron 21g del polvo en 1l de agua purificada y se mezclaron para homogenizar usando calor y agitación frecuente durante unos minutos hasta disolver cualquier grumo, finalmente se esterilizó el medio por 15 min a 121°C para asegurar su esterilidad. Según las indicaciones del manual CSLI M07-A10 el caldo fue almacenado y se dejó reposar durante una noche en

refrigeración a temperatura de 2-8°C. Antes de su uso fue templado hasta alcanzar la temperatura ambiente y fue ajustado en campana de esterilidad agregando las cantidades de las soluciones catiónicas, primero se adiciono la solución de Mg^{++} y se mezcló con agitación suave, después se agregó la solución de Ca^{++} de la misma manera. Finalmente se comprobó que nuestro caldo tuviera un pH final de entre 7.2 y 7.4 a una temperatura ambiente (25°C) para ser usado en el ensayo.

Preparación y ajuste del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo se elaboró una mezcla de cloruro de bario ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) con una turbidez equivalente al estándar McFarland 0.5 (1×10^8 UFC/ml) según las especificaciones del manual.

Se utilizó el método de suspensión directa de colonias, ya que es el más conveniente para la dilución de colonias bacterianas y es el más recomendado en pruebas de microdilución. Los aislados fueron cultivados en agar sangre durante 18-24 Hrs previas al ensayo y fueron diluidas en solución fisiológica 0.9% estéril. Se tomaron las colonias necesarias para conseguir la turbidez del estándar de Mcfarland. Dentro de los primeros 15 minutos del ajuste del inóculo se realizó una segunda dilución en solución salina 1:20 (1ml de la suspensión en 19 del diluyente) para alcanzar una concentración aproximada de 5×10^6 UFC. De esta segunda dilución se agregó dentro de las placas de prueba 0.01ml del inóculo para alcanzar una concentración final aproximada de 5×10^4 UFC en cada pozo de la placa de microdilución.

Método de Microdilución en Caldo

Es llamado así porque involucra el uso de pequeños volúmenes de caldo repartidos en placas de plástico estériles con pozos de fondo redondo. En esta prueba utilizamos platos de Elisa de 96 pozos de poliestireno sin tapa y estériles (CORNING 25802).

Para preparar las placas de microdilución se realizaron diluciones dobles de los agentes antimicrobianos utilizando el caldo previamente refrigerado y ajustado. Se utilizaron tubos de ensayo con tapa de rosca estériles y pipetas automáticas para medir el volumen indicado para cada tubo. Según los procedimientos del manual, se utilizó una pipeta para medir y distribuir el caldo en todos los tubos de dilución y otra para agregar la solución stock del antimicrobiano, en los pasos subsecuentes de la dilución se utilizó una pipeta nueva para cada uno de los tubos. Los tubos se mantuvieron en agitación constante para evitar la precipitación de los antimicrobianos. Cada una de las concentraciones fue depositada en los pozos según se muestra a continuación. Para las placas de las cepas control se utilizaron 12 pozos para cada antibiótico, en 6 pozos se depositaron 0.1ml de caldo estéril y 0.01ml del inóculo estandarizado y ajustado. Los controles negativos fueron 6 pozos con caldo estéril.

Cuadro 3.- Configuración de placas para cepas control ($\mu\text{g/ml}$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CEF 256	CEF 128	CEF 64	CEF 32	CEF 16	CEF 8	CEF 4	CEF 2	CEF 1	CEF 0.5	CEF 0.25	CEF 0.125
B	ENR 256	ENR 128	ENR 64	ENR 32	ENR 16	ENR 8	ENR 4	ENR 2	ENR 1	ENR 0.5	ENR 0.25	ENR 0.125
C	GEN 256	GEN 128	GEN 64	GEN 32	GEN 16	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 1	GEN 0.5	GEN 0.25	GEN 0.125
D	OXI 256	OXI 128	OXI 64	OXI 32	OXI 16	OXI 8	OXI 4	OXI 2	OXI 1	OXI 0.5	OXI 0.25	OXI 0.125
E	PEN 128	PEN 64	PEN 32	PEN 16	PEN 8	PEN 4	PEN 2	PEN 1	PEN 0.5	PEN 0.25	PEN 0.125	PEN 0.0625
F	TIL 256	TIL 128	TIL 64	TIL 32	TIL 16	TIL 8	TIL 4	TIL 2	TIL 1	TIL 0.5	TIL 0.25	TIL 0.125
G	T/S 125/625	T/S 62.5 /312.5	T/S 31.25 /156.25	T/S 15.62 /78.12	T/S 7.81 /39.06	T/S 3.90 /19.53	T/S 1.95 /9.76	T/S 0.97 /4.88	T/S 0.48 /2.44	T/S 0.24 /1.22	T/S 0.12 /0.61	T/S 0.06 /0.30
H	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Se seleccionaron las concentraciones de antimicrobianos para las pruebas de sensibilidad de los aislados de *S.aureus* como se muestra en la figura siguiente, los recuadros negros señalan los puntos de quiebre para determinar si la bacteria es sensible, intermedia (dosis dependiente) o resistente a la concentración sometida.

Cuadro 4.- Placas de prueba para aislados de S. aureus

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CEF 8	CEF 4	CEF 2	CEF 1	CEF 0.5	CEF 0.25	CEF 8	CEF 4	CEF 2	CEF 1	CEF 0.5	CEF 0.25
B	ENR 4	ENR 2	ENR 1	ENR 0.5	ENR 0.25	ENR 0.125	ENR 4	ENR 2	ENR 1	ENR 0.5	ENR 0.25	ENR 0.125
C	GEN 64	GEN 32	GEN 16	GEN 8	GEN 4	GEN 2	GEN 64	GEN 32	GEN 16	GEN 8	GEN 4	GEN 2
D	OXI 64	OXI 32	OXI 16	OXI 8	OXI 4	OXI 2	OXI 64	OXI 32	OXI 16	OXI 8	OXI 4	OXI 2
E	PEN 2	PEN 1	PEN 0.5	PEN 0.25	PEN 0.125	PEN 0.0625	PEN 2	PEN 1	PEN 0.5	PEN 0.25	PEN 0.125	PEN 0.0625
F	TIL 32	TIL 16	TIL 8	TIL 4	TIL 2	TIL 1	TIL 32	TIL 16	TIL 8	TIL 4	TIL 2	TIL 1
G	T/S 31.25 /156.25	T/S 15.62 /78.12	T/S 7.81 /39.06	T/S 3.90 /19.53	T/S 1.95 /9.76	T/S 0.97 /4.88	T/S 31.25 /156.25	T/S 15.62 /78.12	T/S 7.81 /39.06	T/S 3.90 /19.53	T/S 1.95 /9.76	T/S 0.97 /4.88
H	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-

Para optimizar el uso de las placas se depositaron 6 diluciones de cada antimicrobiano, tres pozos control de crecimiento y tres pozos control negativo por duplicado. Se probaron dos aislados en cada una de las placas. Después de depositar los antimicrobianos diluidos en las placas, éstas fueron inoculadas dentro de los primeros 15 minutos de haber ajustado la concentración de bacterias para evitar que saliera del parámetro de la prueba. Las placas fueron selladas en bolsas plásticas estériles para evitar la evaporación, y rápidamente

fueron introducidas a la incubadora a 36°C durante 20hrs evitando apilar más de 4 placas para mantener la temperatura en las placas centrales. Después del periodo de incubación las placas fueron leídas a simple vista en un ambiente con iluminación adecuada y sobre una lámpara para poder determinar el crecimiento de *S. aureus*.

Validación de la prueba

Para considerar una prueba válida, los pozos de control positivo debieron tener un crecimiento de al menos 2mm en el fondo del pozo, a partir de eso, se comparó la inhibición de las bacterias en los pozos con las dosis de antimicrobianos, se hizo registro fotográfico de cada placa y los resultados fueron anotados. Cada uno de los aislados de *S. aureus* fue probado por duplicado.

Se realizó una prueba para comprobar que la concentración de bacterias en el inóculo fuera el adecuado. Una vez inoculada la placa se tomó una muestra del pozo control de crecimiento de 0.01ml inmediatamente después de ser homogenizada y fue diluida dentro de 10ml de solución salina (dilución 1:1000), se mezcló perfectamente y de la solución se tomó una alícuota de 0.1ml y se esparció sobre la superficie de una placa con agar sangre. Después de la incubación la presencia de entre 40 y 80 colonias fue el indicativo de que la densidad del inóculo era de 5×10^5 UFC/ml. Si el recuento de UFC era demasiado bajo o por arriba del rango, las placas fueron descartadas y la prueba fue repetida.

Extracción de ADN bacteriano

Se utilizó el paquete DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, USA), siguiendo el protocolo de pretratamiento para bacterias Gram-positivas indicado en el manual incluido.

- Después de las pruebas de CMI se tomaron 1 – 4 colonias de los cultivos de validación de cada aislado y fueron inoculadas en 5ml de caldo Todd Hewitt a una temperatura de 35°C con agitación (170rpm) durante 24 horas antes de la extracción de ADN.
- Se colocó 1 ml del cultivo en un micro tubo y se centrifugo a 7500rpm durante 10 minutos.
- Se retiró el sobrenadante cuidadosamente para dejar solamente la pastilla del fondo.
- Se agregaron 100µl de buffer lisis enzimática (20nM Tris-Cl-pH 8.0, 1.2% Triton X-100, 2 mM sodium EDTA, lisozima 20mg/ml), más 5µl de lisostafina (Sigma L7386®) y se incubo con agitación a 37°C por una hora.
- A partir de este paso se prosiguió según lo indica el protocolo en el manual del usuario del paquete.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la detección de genes de resistencia se utilizó la técnica de PCR tiempo final, según los protocolos y los oligonucleótidos propuestos por los siguientes autores.

Cuadro 5. Lista de oligonucleótidos utilizados en el proyecto.

Genes	Secuencias de oligos	Autores
<i>bla Z</i>	F: 5'-AAGAGATTTGCCTATGCTTC-3'	Sawant, A.A., et al 2009.
	R: 5'-GCTTGACCACTTTTATCAGC-3'	
<i>mec A</i>	F: 5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3'	
	R: 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'	
<i>erm A</i>	F: 5'-ATCGGATCAGGAAAAGGACA-3'	
	R: 5'-CACGATATTCACGGTTTACCC-3'	
<i>erm B</i>	F: 5'-AAGGGCATTTAACGACGAAA-3'	
	R: 5'-CTGTGGTATGGCGGGTAAGT-3'	
<i>erm C</i>	F: 5'-TGAAATCGGCTCAGGAAAAG-3'	
	R: 5'-CAAACCCGTATTCCACGATT-3'	
<i>msr A</i>	F: 5'-TGGTACTGGCAAAACACAT-3'	Turutoglu, H., et al 2009.
	R: 5'-AAACGTCACGCATGTCTTCA-3'	
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	F: 5'-GAAGTACGCAGAAGAGA-3'	Turutoglu, H., et al 2009.
	R: 5'-ACATGGCAAGCTCTAGGA-3'	
<i>dfrk</i>	F: 5'-GCTGCGATGGATAATGAACAG-3'	Febler, A. et al 2010.
	R: 5'-GGACGATTTCAACAACCATTAAGC-3'	
<i>gyr A</i>	F: 5'-AGTACATCGTCGTATACTATATGG-3'	Goswitz, J.J., et al 1992.
	R: 5'-ATCACGTAACAGTTCAAGTGTG-3'	
<i>tet K</i>	F: 5'-TCGATAGGAACAGCAGTA-3'	Gao, J., et al 2011.
	R: 5'-CAGCAGATCCTACTCCTT-3'	

<i>tet M</i>	F: 5'-CCGCACCCTCTACTACAA-3'	
	R: 5'-CATTCCACTTCCCAACG-3'	
<i>tet L</i>	F: 5'-CATTTGGTCTTATTGGATCG-3'	Silva, C.C.N. et al 2013.
	R: 5'-ATTACACTTCCGATTTCGG-3'	

Para la amplificación de los genes de resistencia se utilizó el termociclador iCycler (BIORAD, USA). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25µl. La mezcla se realizó agregando 14µl de agua grado molecular, 5µl de Buffer 5X, 0.5µl de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados) 10mM, 1.5µl de MgCl₂ 50mM, 1µl de cada oligonucleótido, 1µl de *Taq* polimerasa y 1µl (200ng) de ADN templado, dentro de tubos para microcentrifuga de 0.2ml. En la siguiente tabla se especifican los programas de PCR que se utilizaron para cada gen y las concentraciones de los oligonucleótidos.

Cuadro 6.- Condiciones de la reacción de PCR y tamaño de los productos.

Gen	Concentración de oligos	Programas de PCR	Tamaño de producto (pb)
aac(6')/aph(2'')	0.2µM	Pre- 5min a 95°C; 30 ciclos (45seg a 95°C, 45seg a 55°C, 45seg a 72°C) extensión final 5min a 72°C	491
Bla Z	1µM	Pre- 4min a 95°C; 30 ciclos (45seg a 95°C, 45seg a 55°C, 45seg a 72°C) extensión final 5min a 72°C	517
Dfrk	1µM	Pre- 5min a 94°C; 30 ciclos	214

		(45seg a 94°C, 45seg a 58°C, 45seg a 72°C) extensión final 5min a 72°C	
Erm A	1µM	Pre- 4min a 95°C; 30 ciclos (45seg a 95°C, 45seg a 55°C, 30seg a 72°C) extensión final 5min a 72°C	486
Erm B			423
Erm C			272
Gyr A	1µM	Pre- 5min a 94°C; 30 ciclos (1min a 94°C, 1min a 55°C, 30seg a 72°C) extensión final 5min a 72°C	280
Mec A	1µM	Pre- 4min a 95°C; 30 ciclos (45seg a 95°C, 45seg a 55°C, 45seg a 72°C) extensión final 5min a 72°C	533
Mrs A	1µM	Pre- 4min a 95°C; 30 ciclos (45seg a 95°C, 45seg a 55°C, 1min a 72°C) extensión final 5min a 72°C	1000
Tet L	1µM	Pre- 5min a 95°C; 35 ciclos (30seg a 95°C, 45seg a 55°C, 1min a 72°C) extensión final 5min a 72°C	576
Tet K	10µM	Pre- 5min a 95°C; 30 ciclos (30seg a 95°C, 30seg a 55°C, 30seg a 72°C) extensión final 5min a 72°C	169
Tet M			351

Se analizaron 10µl del producto final amplificado con azul de bromofenol por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con 0.5µg/ml de bromuro

de etidio, en una solución TAE 1X (48.4gr Tris, 11.4ml ácido acético glacial, 3.7gr EDTA en 1 litro de agua desionizada). Se corrió por 1 hora a 100V. Se utilizaron 3µl del marcador de peso molecular de 100pb (Promega Inc.) en cada gel. Como paso final los geles se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP Inc.) y fueron foto documentados.

VI. RESULTADOS y DISCUSION

Concentraciones mínimas inhibitorias de *Staphylococcus aureus*

El rango de concentraciones de antimicrobianos probadas inhibieron el crecimiento del total de aislados elegidos para su evaluación (resistente n=26 y multidroga resistente n=23). La concentración más baja del antimicrobiano trimetoprim/sulfametoxazola (0.97/4.88µg/ml) inhibió el crecimiento del 100% de los aislados de ambos grupos. Esto podría deberse que no se pudo alcanzar la concentración sugerida por el CSLI debido a la concentración del medicamento en su presentación comercial, sin embargo, el rango de diluciones de este antimicrobiano abarcaban los puntos de quiebre establecidos.

Ninguno de los aislados presento crecimiento en las concentraciones más altas de la prueba. Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para ceftiofur (0.25µl/ml), gentamicina (2µl/ml), oxitretaciclina (2µl/ml), y trimetoprim/sulfametoxazola (0.97/4.88µg/ml), fueron la misma concentración, o estuvieron dentro del rango de una dilución de diferencia entre el CMI₅₀ y el CMI₉₀ en ambos grupos como la tilosina que mostro un CMI₅₀ de 2µl/ml en el grupo de los multirresistentes y 1µl/ml en los resistentes.

Enrofloxacin mostro valores de CMI₅₀ de 0.125µl/ml en ambos grupos y CMI₉₀ a una dilución de diferencia para el grupo de aislados resistentes (0.25µl/ml), sin embargo, este valor variaron tres diluciones en el grupo de los aislados multidroga resistentes (1µl/ml).

La variación más grande de diluciones entre el CMI₅₀ y el CMI₉₀ fue para la penicilina, los aislados del grupo multiresistente tuvieron un CMI₅₀ de 0.062µg/ml y un CMI₉₀ de 2µg/ml respectivamente. Los aislados del grupo resistente tuvieron un CMI₅₀ de 0.125µg/ml y un CMI₉₀ de 2µg/ml.

Oliveira et al (2000), en un estudio donde se midieron las concentraciones minimas inhibitorias de 811 aislados de *S.aures* de 11 países entre los que se incluyen, Dinamarca, Inglaterra, Finlandia, Alemania, Islandia, Irlanda, Noruega, Suecia, Suiza, Estados Unidos y Zimbabue. Los agentes antimicrobianos utilizados fueron penicilina, ampicilina, oxacilina, cefalotina, ceftiofur, amoxicilina-clavulanato, penicilila-novobiocin, enrofloxacin, premafloxacin, eritromicina, clindamicina, lincomicina, pirlimicina, neomicina, lincomicina-neomicina y sulfametazime. Los MIC₉₀ de todos los aislados fueron 0.5, 1.0, 1.0, 0.5, 1.0, ≤0.06, 0.125, 0.125, ≤0.0078, 0.5, 1.0, 16.0, 1.0, 2.0, 0.5 y 4.0 µg/ml. Respectivamente. Solo una pequeña variación entre los MIC₉₀ de cada país pudo ser observada en la mayoría de los antimicrobianos probados. En similitud con este estudio podemos decir que los niveles de resistencia de los antimicrobianos son generalmente bajos independientemente del origen y de las diferencias en el uso de antimicrobianos en varios países, además de la aplicación de programas de control de la mastitis para prevenir las infecciones limita la exposición de los animales infectados con *S. aureus* a los fármacos antimicrobianos.

antimicrobiano	PQ µg/ml	Grupo	n	Resistencia (%)	porcentaje de aislamientos en cada CMI indicada (µg/ml)										
					0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Ceftiofur	≤ 2	MR	23	0	-	-	95.6	4.3	0	0	0	0	-	-	-
		R	26	0	-	-	65.3	<u>26.9</u>	7.6	0	0	0	-	-	-
Enrofloxacin	≤ 0.25	MR	23	34.7	-	65.2	0	0	<u>34.7</u>	0	0	-	-	-	-
		R	26	3.8	-	80.7	<u>15.3</u>	0	3.8	0	0	-	-	-	-
Gentamicina	≤ 4	MR	23	0	-	-	-	-	-	86.9	<u>13.04</u>	0	0	0	0
		R	26	0	-	-	-	-	-	100	0	0	0	0	0
Oxitetraciclina	≤ 4	MR	23	0	-	-	-	-	-	100	0	0	0	0	0
		R	26	0	-	-	-	-	-	96.1	3.8	0	0	0	0
Penicilina G procaínica	≤ 0.125	MR	23	21.7	73.9	4.3	0	0	0	<u>21.7</u>	-	-	-	-	-
		R	26	50	46.1	3.8	0	15.3	23.07	<u>11.53</u>	-	-	-	-	-
Tilosina	≤ 2	MR	23	0	-	-	-	-	8.6	86.9	<u>4.3</u>	0	0	0	-
		R	26	0	-	-	-	-	73.07	<u>26.9</u>	0	0	0	0	-

PQ = punto de quiebre (MIC a la que un aislado es considerado susceptible de acuerdo al CLSI, 2014).

MR = aislados con previo perfil multirresistente; R= aislado con perfil resistentes.

Las líneas indican las concentraciones que no fueron evaluadas para cada antimicrobiano.

El valor MIC50 se muestra en letras negritas, el valor MIC90 se muestra subrayado. Donde el valor MIC50 y MIC90 son el mismo estará subrayado y en letras negritas.

Cuadro7.- Distribución de CMI de los aislados de *Staphylococcus aureus* (n=49) según su perfil de resistencia previo

Resistencia de *Staphylococcus aureus*

Del total de aislados seleccionados (n=49), 22 (44.8%) fueron susceptibles a todos los antimicrobianos, 27 (55.1%) exhibieron resistencia a una clase de antimicrobiano, ninguno de los aislados mostro ser multidroga resistente. La resistencia a Penicilina G fue detectada en 18 (36.7%) aislados y 9 (18.3%) aislados mostraron resistencia a enrofloxacin. Ninguno de los aislados seleccionados de ambos grupos mostro resistencia a ceftiufur, gentamicina, oxitetraciclina, tilosina y trimetoprim/sulfametoxazola. Únicamente uno de los aislados del grupo de los multirresistentes mostró resistencia intermedia a tilosina.

A diferencia de estudios previos (Oliveira et al., 2012) donde se han hallado prevalencias de aislados susceptibles de más del 75%, en este estudio el porcentaje de susceptibilidad es más bajo (44.8) y puede deberse a que en este estudio el número de los aislados no son equivalentes entre los lugares de procedencia. En diferentes regiones del mundo se han encontrado diversidad en el porcentaje de aislados resistentes, por ejemplo en un estudio realizado en los hatos lecheros de Israel (Younis et al., 2000) se identificó 96.6% de aislados resistentes a penicilina; en el estudio de Oliveira et al. (2012), en Brasil se identificó un porcentaje de resistencia a penicilina del 13.7% de aislado provenientes de mastitis subclínica. En este estudio se encontró una prevalencia de 36.7%, esto sugiere que el uso de este antimicrobiano varía entre cada región, desde aquellas regiones donde sigue siendo la primera

opción para el tratamiento de infecciones en ganado bovino y otras que han modificado el uso de este antibiótico.

Se han realizado diversos estudios para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de *S. aureus*, para los cuales se han utilizado métodos cualitativos como la técnica de difusión en disco y métodos cuantitativos como las pruebas de micro diluciones en caldo usando paneles de pruebas comerciales que contienen un rango estandarizado de concentraciones de antimicrobianos o paneles diseñados por el propio laboratorio según las necesidades del proyecto. En estos paneles frecuentemente los aislados son inhibidos en las concentraciones más altas o bajas, mostrando que otras diluciones deberían ser incluidas. La comparación de los resultados de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana entre los estudios se dificulta por la diferencia en sus metodologías (Oliveira et al, 2012).

Los aislados que exhibieron resistencia a una o dos clases de antimicrobianos provenían de 4 de los establos. El 100% de los aislados provenientes de Mxl-1 (n=9) mostraron resistencia a enrofloxacin (inhibición a CMI 1µg/ml), y de estos un solo aislado mostro resistencia intermedia a tilosina (CMI 4µg/ml).

Solamente uno de los aislados provenientes de Mxl-2 (n=13) mostró resistencia a penicilina g (CMI 2µg/ml). Todos los aislados provenientes de Tecate (n=13) mostraron resistencia a penicilina g (fueron inhibidas en un rango de CMI de 0.5 - 2µg/ml). En tanto los provenientes de La Paz (n=5), que también mostraron resistencia a penicilina g, fueron todas inhibidas a la concentración de 2µg/ml. Los aislados provenientes de Ensenada (n=4) y Ciudad Constitución (n=5)

fueron sensibles a todos los antimicrobianos de la prueba. Esto da una idea de la variación en el uso de los tratamientos que en cada rancho y la respuesta de cada antimicrobiano, conocer el estado de resistencia en el hato y las concentraciones a los cuales son inhibidos los aislados, nos permite sugerir el uso de antibióticos adecuados para el tratamiento de mastitis.

Los antibióticos más utilizados para tratar al ganado bovino, son fluoroquinolonas (enrofloxacin), penicilinas (penicilina G procaínica, amoxicilina-acido clavulánico), sulfonamidas (trimetoprim-sulfametoxazol, sulfadiazina) aminoglicosidos (dihidrostreptomycin), tetraciclinas (oxitetraciclina) y cefalosporinas (cefalotina, ceftiofur). Las diferencias en cuanto a la resistencia de los aislados obtenidos de cada región, sugiere que los tratamientos para mastitis y otras infecciones, es también muy diferente en cada uno de los establos de procedencia y varían desde ningún tratamiento, la utilización de tratamientos naturales, hasta el uso desmedido de los antibióticos comerciales disponibles para el tratamiento de la mastitis y otras infecciones que pueden generar una selección de microorganismos resistentes en la ubre.

Identificación de genes de resistencia.

De las pruebas de PCR punto final para identificación de genes de resistencia obtuvimos lo siguiente; el gen *gyr A* asociado con la resistencia a fluoroquinolonas fue detectado en el 100% los aislados, el gen *bla Z* fue identificado en 15 aislados (30.6%) de los cuales 12 pertenecen al grupo de los resistentes y 3 al grupo de los multirresistentes. Tres aislados (6.1%)

pertenecientes al grupo de los resistentes fueron positivos a la identificación del gen *tet L*, sin embargo no hubo identificación de los genes *tet K* y *tet M*.

Cuadro 8. Identificación de genes de resistencia.

Origen	Grupo	n	Genes de Resistencia											
			<i>mecA</i>	<i>blaZ</i>	<i>gyrA</i>	<i>tetK</i>	<i>tetL</i>	<i>tetM</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>mrsA</i>	<i>dfrK</i>	<i>aac(6')/aph(2'')</i>
Mxli-1	MR	8	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mxli-2	MR	5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	R	1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tecate	MR	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	10	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	1	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	R	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ensenada	R	4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
La Paz	MR	3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MR	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Constitución	MR	3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

n= Número de aislados con el mismo perfil de resistencia
MR= Aislado perteneciente al grupo de los Multirresistentes.
R= Aislado perteneciente al grupo de los Resistentes.
+ = identificación positiva del gen. - = no se identificó el gen.

No se detectó ni uno solo aislado positivo al grupo de genes *erm A*, *erm B*, *erm C*, *mrs A* asociado a macrólidos, así como tampoco a los genes *mec A*, *dfr K* y *aac(6')/aph(2'')* asociados a la resistencia a methicilina, trimetoprim y

aminoglucosidos respectivamente, esto puede deberse a la baja exposición de las bacterias a los antimicrobianos, sin embargo diversos estudios se han llevado a cabo en aislados de *Staphylococcus aureus* Methicilina Resistente de origen animal, y de origen nosocomial, y han reportado una detección elevada de estos genes de resistencia, los autores coinciden en que la presencia del gen *mecA* puede potenciar el efecto de otros genes de resistencia.

Comparación de resistencia fenotípica y genotípica de *S. aureus*

Cuadro 9. Comparación de aislados con resistencia fenotípica y detección de genes de resistencia.

Antimicrobiano		Penicilina G			Enrofloxacin		Oxitetraciclina		
Origen	Aislados	bla Z	CMI (µg/ml)		gyr A	CMI (µg/ml)		tet L	CMI (µg/ml)
MXLI-1	9	-	≤0.065	S	+	1	R	-	≤2
MXLI-2	2	-	≤0.065	S	+	≤0.125	S	+	≤2
	1	+	2	R	+	≤0.125	S	-	≤2
TECATE	2	+	1	R	+	0.25	S	-	≤2
	1	-	0.5	R	+	0.25	S	-	≤2
	1	-	2	R	+	≤0.125	S	-	≤2
	1	+	0.5	R	+	≤0.125	S	+	≤2
	4	+	1	R	+	≤0.125	S	-	≤2
	3	+	0.5	R	+	≤0.125	S	-	≤2
	1	+	2	R	+	≤0.125	S	-	≤2
LA PAZ	3	+	2	R	+	≤0.125	S	-	≤2
	1	-	2	R	+	≤0.125	S	-	≤2

R= Resistente S= Sensible.

No se incluyeron aislados en esta tabla que no dieron positivos ni en detección de genes ni en la prueba de sensibilidad.

En el 100% de los aislados se pudo identificar el gen *gyr A*, sin embargo, solamente 9 (18.36%) de ellos exhibieron resistencia fenotípica a enrofloxacin, 8 del grupo multirresistente y 1 del grupo resistente, los cuales provienen del rancho Mxl-1 esto sugiere el uso desmedido de este medicamento en tratamientos previos en el hato, Joseph J. G y sus colaboradores (1992) describieron que existen tres posibles mecanismos de resistencia . 18 (36.7%) aislados demostraron resistencia a Penicilina G en la prueba de sensibilidad (CMI), de los cuales 15 (30.6%) fueron positivos a la detección del gen *bla Z*, 5 de los aislados pertenecieron al grupo de multirresistentes y provienen de la región de La Paz, los otros 13 del grupo de resistentes provienen del área de Tecate.

Se detectó el gen *tet L* en únicamente 3 (6.1%) aislados, los cuales demostraron ser sensibles a las concentraciones más bajas de oxitetraciclina, pertenecen al grupo de los aislados resistentes y provienen del área de Mxl-2 y Tecate. No obstante deben hacerse pruebas con otros antibióticos de la misma familia para verificar la sensibilidad de estos aislados a la familia de las tetraciclinas.

CONCLUSION

En nuestro estudio, los aislados de *Staphylococcus aureus* provenientes de vacas con mastitis de diferentes establos de la Península de California mostraron una alta susceptibilidad a la mayoría de los antimicrobianos a los que fueron probados y no se encontró ninguna cepa multirresistente. En comparación, en un estudio previo se han reportado niveles de resistencias más altas a varias familias de antimicrobianos usando la prueba de difusión en disco; se habrían que hacer un estudio más extenso con varios antibióticos de cada familia de antimicrobianos para comprobar que no hay resistencia a ellos y poderlas clasificar correctamente como resistentes o susceptibles.

La resistencia a Penicilina G fue la más elevada que se encontró entre los aislados, la mayoría de ellos provienen del área de Tecate. Así como los aislados resistentes a Enrofloxacin provienen del área de Mexicali y La paz. Esto sugiere que el uso de diferentes tratamientos en cada rancho y región, han ido desarrollando los mecanismos de resistencia a estas bacterias a cada antibiótico en particular.

De los doce genes seleccionados para esta prueba, se identificaron: el gen *gyr* A asociado con la resistencia a fluoroquinolonas, el gen *bla* Z para betalactámicos y el gen *tet* L asociado a tetraciclinas, estos resultados coinciden en su mayoría con los resultados de resistencia en la prueba de

sensibilidad antimicrobiana, a excepción de los aislados con gen tet L, que mostro sensibilidad a la oxitetraciclina.

El uso de técnicas de identificación molecular, como es la PCR, es una herramienta que nos brinda la oportunidad de tener resultados rápidos y confiables al identificar agentes patógenos que provocan la mastitis, así como los genes que se asocian con sus características de resistencia y patogenicidad. Sin embargo, la detección de genes asociados a resistencia no asegura la resistencia fenotípica del aislado, por lo tanto es importante el uso de técnicas para medir la susceptibilidad antimicrobiana ya sean cualitativas como la prueba de difusión en disco, o cuantitativas como son las concentraciones mínimas inhibitorias. El uso conjunto de estas técnicas puede ayudarnos a controlar el desarrollo de la resistencia a los agentes antimicrobianos, así como optimizar el uso de los tratamientos disponibles. A demás con el uso de registro se puede monitorear la evolución de la resistencia en los hatos ganaderos, así como la eficacia de los tratamientos aplicados.

VIII. LITERATURA CITADA

- Andrews, J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (Suppl. 1):5-16
- Bardiau, M., K. Yamazaki, J. N. Duprez, B. Taminiau, J. G. Mainil y I. Ote. 2013. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. *Letters in Applied Microbiology*; 57; 181-186.
- Bengtsson B. y Greko C. 2014. Antibiotic resistance – consequences for animal health, welfare, and food production. Review Article. *Upsala Journal of Medical Sciences*; 119: 96-102.
- Cervinkova. D., Vlkova, H., Borodacova, I., Makovcova, J., Babak, V., Lorencova, A., Vrtkova I., Marosevic, D., Jaglic. Z. 2013. Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. *Veterninari Medicina*, 58(11): 567-575.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Documento número M07-A10. “Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard”, 10th edición, enero 2015.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Complemento número M100-S24. “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fourth Informational Supplement” enero 2014
- Delgado, S., García, P., Fernández, L., Jiménez, E., Rodríguez-Baños, M., del Camp, Rosa., & Rodríguez, J. M. 2011. Characterization of *Staphylococcus*

aureus strains involved in human and bovine mastitis. FEMS Immunol Med. Microbiol 62. 225-235.

De Los Santos, R., Fernández, M., Carro, S., Zunino, P. 2014. Characterisation of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine subclinical mastitis in two Uruguayan dairy farms. Arch. Med. Vet. 46. 315-320.

De Oliveira A. P., Watts J. L., Salmon S. A., Aarestrup F. M., 2000. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Europe and the United States. Journal of Dairy Science. 855-862.

El Behiry, A., Schlenker, G., Szabo, I., and Roesler, U. 2012. *In vitro* Susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different Antimicrobial agents. J. Vet. Sci. 13(2), 153-161.

Febler, A., Scott, C., Kadlec, K., Ehrlich, R., Monecke, S., and Schwarz, S. 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. J. Antimicrob Chemother. 65; 619-625.

Gao, J., Ferreri, M., Xiu Q. Liu., Li B. Chen, Jing L. Su, Bo Han. 2011. Development of multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and selected antibiotic resistance genes in bovine mastitic milk samples. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 23(5). 894-901.

Haran, K. P., Godden, S. M., Boxrud. D., Jawahir. S., Bender, J. B., and Sreevatsan. S. 2012. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms. J. Clin. Microbiol. 50 (3): 688.

- Intrakamhaeng, M., and Komutarin, T. 2012. Antibiotics resistance and RAPD-PCR typing of multidrug resistant MRSA isolated from bovine mastitis cases in Thailand. *Science Asia* 38: 30-35.
- Kot, B., Piechota, M., Wolska, K. M., Frankowska, A., Zdunek, E., Binek, T., Kłopotowska E., Antosiewicz, M. 2012. Phenotypic and Genotypic Antimicrobial resistance of staphylococci from bovine milk. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. Vol. 15, No. 4. 677-683.
- Kot, B., Piechota, M., Antos-Bielska, M., Zdunek, E., Wolska, K. M., Binek, T., Olszewska, J., Gulinski, P., Trafny, E. A. 2012. Antimicrobial resistance and genotypes of staphylococci from bovine milk and the cowshed environment. *Polish Journal of Veterinary Sciences* Vol. 15, No. 4. 741-749.
- Kumar, R., Yadav, B.R., Singh, R. S. 2010. Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from Milk of Mastitis Crossbred Cattle. *Curr Microbiol*. 60: 379-386.
- Kumar, R., Yadav, BR. and Singh RS. 2011. Antibiotic resistance and pathogenicity factors in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic Sahiwal cattle. *Indian Academy of Sciences*. 36: 175-188.
- Oliveira, L., Langoni, H., Hülland, C., and Ruegg, P.L. 2012. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from Clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *J. Dairy Sci*. 95:1913-1920.
- Sweda, P., Schielmann, M., Frankowska, A., Kot, B., Zalewska, M. 2013. Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows with Mastitis in Eastern Poland an Analysis of Susceptibility of Resistant Strains to

Alternative Nonantibiotic Agents: Lysostaphin, Nissin and Polymyxin B. *Jou. Vet. Med. Sci.* 76(3): 355-362.

Onur Azizoglu, R., Lyman, R., and Anderson K. L. 2013. Bovine *Staphylococcus aureus*: Dose response to iodine and chlorhexidine and effect of iodine challenge on antibiotic Susceptibility. *Jou. Dairy Sci.* 96:993-999.

Paterson, G. P., Morgan, F. J. E., Harrison, E. M., Peacock, S. J., Parkhill, J., Zadoks, R. N. and Holmes, M. A. 2014. Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine Bulk tank milk in Great Britain. *J. Antimicrob Chemother*; 69: 598-602.

Romero, A. T. 2004. Situación actual de la mastitis en México. Dpto. de Producción Animal, FMVZ-UNAM. México D. F. pp. 122-134.

Sakwinska, O., Morisset, D., Madec, J-Y., Waldvogel, A., Moreillon, P., and Haenni, M. 2011. Link between Genotype and Antimicrobial Resistance in Bovine Mastitis-Related *Staphylococcus aureus* Strains, Determined by Comparing Swiss and French Isolates from the Rhone Valley. *American Society for Microbiology. Applied and Enviromental Microbiology.* p 3428-3432.

Turkyilmaz, S., Tekbiyik, S., Oryasin, E., and Bozdogan, B. 2009. Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant *Sthaphylococcus aureus* isolated from Bovine Milk. *Zoonoses and Public Health.* 57. 197-203.

